

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号  
特表2002-512787  
(P2002-512787A)

(43) 公表日 平成14年5月8日(2002.5.8)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/02	4 B 0 2 4
5/10		C 1 2 N 15/00	A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02		5/00	B 4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2000-545985(P2000-545985)	(71) 出願人	ユニヴァーシティー オブ エディンバラ UNIVERSITY OF EDINBURGH
(86) (22) 出願日	平成11年4月29日(1999.4.29)		
(85) 翻訳文提出日	平成12年10月30日(2000.10.30)		
(86) 国際出願番号	P C T / G B 9 9 / 0 1 3 3 3		イギリス国 イーエイチ8 9ワイエル エディンバラ サウス ブリッジ オール ド カレッジ (番地なし)
(87) 国際公開番号	W O 9 9 / 5 5 8 4 1	(72) 発明者	スミス、オースチン
(87) 国際公開日	平成11年11月4日(1999.11.4)		イギリス国 イーエイチ9 3ジェイキュー ー エディンバラ ウェスト マインツ ロード ザ キングス ビルディングス センター フォー ジェノーム リサーチ (番地なし)
(31) 優先権主張番号	9 8 0 9 1 7 8 . 8	(74) 代理人	弁理士 金田 暢之 (外2名)
(32) 優先日	平成10年4月29日(1998.4.29)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	イギリス (G B)		

(54) 【発明の名称】 幹細胞を得る方法

(57) 【要約】

幹細胞を得るための方法であって、(a) 所望の幹細胞および(b) 所望の幹細胞以外の細胞において特異的に発現されるマーカーをコードする遺伝子を含む体細胞を得ること；除核卵母細胞を得ること；体細胞の核を除核卵母細胞中に移してトランスジェニック卵母細胞を形成すること；トランスジェニック卵母細胞を培養して、トランスジェニック卵母細胞から誘導された細胞の培地を生成すること、およびマーカーを発現する培地の細胞を認識することを含んでなり、それによりその細胞の核が再プログラムされたことを示すものである方法。前記核再プログラム法を用いた直接または間接的に得られる核および幹細胞を再プログラムすることができる因子についてのアッセイも記載されている。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 予定の種の幹細胞を得るための方法であって、

(a) 所望の幹細胞および(b) 所望の幹細胞以外の細胞において特異的に発現されるマーカーをコードする遺伝子を含む、予定の種の体細胞を得ること、

除核卵母細胞を得ること、

体細胞の核を、除核卵母細胞中に移してトランスジェニック卵母細胞を形成すること、

トランスジェニック卵母細胞を生体外で培養して、トランスジェニック卵母細胞から誘導された細胞の培地を生成すること、および

マーカーを発現する培地の細胞を認識することを含んでなる方法。

【請求項2】 マーカー遺伝子を発現する細胞を選択的に増殖させることを含む請求項1に記載の方法。

【請求項3】 トランスジェニック卵母細胞を培養して、内部細胞塊および栄養外胚葉細胞を含む胚または胚構造を形成すること、および内部細胞塊の細胞がマーカー遺伝子を発現するかどうか決めることを含む請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 マーカーが選択性マーカーであり、選択性マーカーを発現しない細胞を培地中で選択的に殺すまたは除去し得る請求項1、2または3に記載の方法。

【請求項5】 選択性マーカーが抗生物質抵抗性である請求項4に記載の方法。

【請求項6】 マーカーがレポーターであり、マーカーを発現する細胞を培地中で視覚的に認識し得る請求項1、2または3に記載の方法。

【請求項7】 レポーター遺伝子が、GFPまたはルシフェラーゼのような、光により刺激される産物をコードする請求項6に記載の方法。

【請求項8】 マーカーが不朽化遺伝子である請求項1、2または3に記載の方法。

【請求項9】 体細胞に、選択性マーカーおよびレポーターマーカーを導入

することを含む請求項1～8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】 マーカーをコードする遺伝子を、この方法により得られる幹細胞の核から除去し得る、先の請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項11】 マーカーをコードする遺伝子を、部位特異性リコンビナーゼを用いてそのように除去し得る請求項10に記載の方法。

【請求項12】 体細胞が哺乳動物細胞である先の請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項13】 体細胞がヒト細胞である請求項12に記載の方法。

【請求項14】 卵母細胞が非ヒト細胞である先の請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項15】 卵母細胞がヒト細胞である請求項1～13のいずれかに記載の方法。

【請求項16】 胚幹細胞を得るための先の請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項17】 胚幹細胞から選択された系列の始原細胞を誘導することを、先の請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項18】 ニューロン始原細胞を得るための請求項17に記載の方法。

【請求項19】 幹細胞を得るための方法であって、  
（a）所望の幹細胞および（b）所望の幹細胞以外の細胞において特異的に発現されるトランス遺伝子を含む体細胞を個体から得ること、  
体細胞の核を、除核卵母細胞中に移すこと、  
卵母細胞を培養して胚または胚構造を形成すること、および  
胚または胚構造中の細胞がトランス遺伝子を発現しているかどうか決めることを含んでなる方法。

【請求項20】 トランス遺伝子が、（a）内部細胞塊の細胞および（b）内部細胞塊の細胞以外の細胞において特異的に発現され、方法は、卵母細胞を培養して胚または胚構造を形成すること、および、内部細胞塊の細胞がトランス遺伝子を発現するかどうか決めることを含んでなる、哺乳動物胚幹細胞を得るため

の請求項19に記載の方法。

【請求項21】 トランス遺伝子が、実質的に細胞または内部細胞塊のみに  
おいて発現される請求項20に記載の方法。

【請求項22】 トランス遺伝子が選択性マーカーをコードし、選択的マ  
ーカーを発現しない細胞を培地中において選択的に殺すまたは除去し得る請求項1  
9～21のいずれかに記載の方法。

【請求項23】 トランス遺伝子が、特定の波長の光を照射されたときに刺  
激されるレポーターマーカーをコードし、レポーターマーカーを発現する細胞を  
、その光の存在下での発光により認識することができる請求項19～21のい  
ずれかに記載の方法。

【請求項24】 体細胞の核に対する、因子の効果についてのアッセイであ  
って、

(a) 所望の幹細胞および(b) 所望の幹細胞以外の細胞において特異的に発  
現されるマーカーを含む核を除核細胞に導入すること、

因子をその細胞中に導入すること、

その細胞を生体外培地中に維持すること、および

その細胞またはその娘細胞のいずれかがマーカーを発現しているかどうか決  
めることを含んでなり、マーカーの発現は、その体細胞核が再プログラムされて所  
望の幹細胞の核になっていることを示すものである方法。

【請求項25】 マーカーが、(a) 多機能幹細胞および(b) 多機能幹細  
胞以外の細胞において特異的に発現される請求項24に記載のアッセイ。

【請求項26】 因子のライブラリーのアッセイのための、請求項24また  
は25に記載のアッセイ。

【請求項27】 卵母細胞の細胞質から抽出されたmRNAから得られたc  
DNAのライブラリーの発現により得られる因子のライブラリーのアッセイのた  
めの、請求項26に記載のアッセイ。

【請求項28】 体細胞の核から多機能細胞の核への再プログラムを誘発す  
る因子を認識するための、請求項24～27のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項29】 体細胞の核から胚幹細胞の核への再プログラムを誘発する

因子を認識するための、請求項24～27のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項30】 胚または胚構造が胚幹細胞を含むかどうか決めるアッセイであって、

(a) 胚幹細胞および(b) 胚幹細胞以外の細胞において特異的に発現されるマーカーを含む体細胞の核を除核卵母細胞に導入すること、

そこから胚または胚構造を得ること、および

胚または胚構造の細胞がマーカーを発現するかどうか決めることを含んでなるアッセイ。

【請求項31】 胚幹細胞中においてのみ実質的に活性化されるプロモーターの制御下にマーカーをコードする配列を含むトランス遺伝子を、体細胞に導入することを含む、請求項30に記載のアッセイ。

【請求項32】 プロモーターが、OCT4遺伝子を発現する細胞中において活性化される請求項31に記載のアッセイ。

【請求項33】 プロモーターがOCT4プロモーターである請求項32に記載のアッセイ。

【請求項34】 トランス遺伝子が、実質的に全ての細胞中において活性化されるプロモーターの制御下に第2のマーカーをコードする配列も含み、アッセイは、除核卵母細胞への核の導入前に第2のマーカーが発現されるかどうか決めることにより、トランス遺伝子が核に安定に形質移入されたかどうか決めることを含んでなる、請求項31～33のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項35】 第2のマーカーのためのプロモーターが $\beta$ -アクチンプロモーターである請求項34に記載のアッセイ。

【請求項36】 請求項1～23のいずれかに記載の方法により得られる胚幹細胞。

【請求項37】 非ヒト卵母細胞から誘導されるヒト胚幹細胞。

【請求項38】 非ヒト哺乳動物卵母細胞から誘導されるヒト胚幹細胞。

【請求項39】 ブタまたはウシ卵母細胞から誘導される請求項38に記載のヒト胚幹細胞。

【請求項40】 ヒト卵母細胞から誘導されるヒト胚幹細胞。

【請求項41】 第1のヒトに移植するためのものであって、第1のヒトと免疫学的に適合性がある、異なるヒトの卵母細胞から誘導された幹細胞。

【請求項42】 第1の種以外の種の卵母細胞から誘導されると共に、胚幹細胞中のみで実質的に発現される選択性マーカーをコードするトランス遺伝子を含んでなる、第1の哺乳動物種の胚幹細胞。

【請求項43】 第1のヒト個体に移植するためのヒト幹細胞またはヒト体細胞の誘導の適しているヒト胚幹細胞を得る方法であって、第1の個体のものとは異なる卵母細胞中に、第1の個体の体細胞からの核を導入することを含んでなる方法。

【請求項44】 ヒト胚幹細胞が、ヒト胚幹細胞中のみで実質的に発現される選択性マーカーをコードするトランス遺伝子を含む請求項43に記載の方法。

【請求項45】 未分化状態を認識するトランス遺伝子を発現する多機能細胞であって、トランス遺伝子の存在は別にして、成体動物に遺伝的に同一である細胞。

【請求項46】 体細胞核を多機能核に再プログラムする方法であって、  
請求項24～29のいずれかのアッセイを行うことにより核の再プログラムを誘発する因子を認識すること、  
体細胞核を得ること、  
除核細胞を得ること、  
体細胞核を除核細胞中に移して組換え細胞を形成すること、および  
組換え細胞を、その因子の存在下に生体外で培養すること  
を含んでなる方法。

【請求項47】 体細胞核を全能核に再プログラムする方法であって、  
請求項24～29のいずれかのアッセイを行うことにより核の再プログラムを誘発する因子を認識すること、  
体細胞核を得、それをその因子の存在下に培養すること、  
除核細胞を得ること、  
体細胞の核を除核細胞中に移して組換え細胞を形成すること、および  
組換え細胞を生体外で培養すること

を含んでなる方法。

【請求項48】 (a) 所望の全能細胞および(b) 所望の全能細胞以外の細胞において特異的に発現されるマーカーをコードする遺伝子を体細胞に導入すること、

体細胞の核を除核卵母細胞中に移すこと、および

それから得られる胚の細胞がマーカーを発現しているかどうか決めることをさらに含んでなる、請求項46または47に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(技術分野)**

本発明は、体細胞の核再プログラム、核移植胚から幹細胞を得るための方法、および特に、胚幹（E S）細胞を得る方法に関する。本発明は、また、多機能細胞、および体細胞核を多機能細胞核に再プログラムするためのアッセイ、ならびに、体細胞核を再プログラムすることができる因子のためのアッセイにも関する。

**【0002】****(背景技術)**

E S細胞は、多成分幹細胞であり、造血幹細胞、ニューロン前駆細胞および皮膚細胞のような広範囲の体組織の発生に用いることができる。生体外でヒト胚幹細胞を発生し得るという治療的価値はかなりのものである。Domikoらは、ウシ卵母細胞質が、異なる哺乳動物種から体細胞核をうまく再プログラムし、初期胚発達を開始させ得ることを示唆している。すなわち、E S細胞が広範囲の哺乳動物胚から得られ、トランスジェニック動物の開発に大きな価値を示すことが期待される。多くの者がE S細胞が得られることを主張しているが、E S細胞をマウス以外から実際に得たことを示すのは、今までE S細胞は形態学的に単離されていたので、現在まで不可能であった。これは、非E S細胞から誘導された胚構造は、E S細胞を含む胚構造と実質的に同じに見えるので、信頼性のない試験である。

**【0003】**

哺乳動物における移植は、現段階では、拒絶反応に関する問題によって妨げられている。異組織が宿主に導入されると、その免疫反応が侵入組織と知覚されたものを攻撃する。この激しく生命を脅かす反応は、免疫抑制剤の使用により防止することができるが、これは宿主を日和見感染に晒す。免疫反応は、宿主自体の組織を移植する場合は誘発されない。遺伝子的に宿主の組織と同一の組織を発生させることができれば、移植において有利である。

**【0004】**



哺乳動物における胚発生は、同等の全能細胞を発生させる一連の分裂から始まる。卵母細胞に蓄積された母系因子は、各種について特徴的な数およびタイミングの分裂を示す。分裂プロセス中に接合ゲノムの活性化が起こる。これに続いて2つの異なる細胞系列、すなわち、外側上皮細胞層の栄養外胚葉、および細胞の内側クラスターである内部細胞塊（ICM）に分かれる。続いて、栄養外胚葉は、胎盤の胚誘導成分に貢献し、一方、ICMは胚独自の構成物質である。ICMは、生殖細胞を含む全ての胎児細胞型を、および一部の胚外組織も発生させる点において多機能である。多機能細胞系の胚幹（ES）細胞は、ICMまたはその直後の多機能後継者である原外胚葉の直接培養により誘導することができる（BrookおよびGardner著、1997年；EvansおよびKaufman著、1981年；Thomsonら著、1996年）。

#### 【0005】

一旦単離されると、多機能幹細胞は、特定の成長因子、および特定の細胞型への分化を誘発する他のシグナル分子の存在下に培養することができる。異なる医学的疾患および症状において特定の組織型が必要である。白血病を患い、化学治療のために自体の造血細胞が失われている個体の治療に造血幹細胞を用いることができる。アルツハイマー病やパーキンソン症候群のような神経退化疾患を患っている個体の治療に、ニューロン始原細胞を用いることができる。個体が重度の火傷または瘢痕化を患った場合、移植に適した皮膚細胞を発生させることができる。すなわち、遺伝的に患者と同じである多機能幹細胞を発生させ得ることには、大きな治療能がある。

#### 【0006】

ヒト多機能幹細胞を作り得るさらなる方法を開発することが望ましい。さらに、所定の個体から多機能幹細胞を発生させ得ることが望ましい。初期胚においてどの細胞が未分化多機能幹細胞であるか容易に認識し得ることも望ましい。さらに、これらの多機能幹細胞を単離し、次に、誘発させて特定の細胞型に分化させ得ることが有利である。最後に、ES細胞中で未分化状態を維持するのに必要な因子を認識し得るアッセイを有することが望ましい。

#### 【0007】

体細胞から胚および生きている子孫を生成させるために、卵母細胞中における核置換が用いられる。このクローニング手順は、遺伝的に同一の組織または個体の生成を可能にするが、現在の手順の効率は非常に低く、少量の核移動胚しか生存能力のある子孫を与えない。これは、ドナー細胞核の不完全な再プログラムが部分的原因である。国際特許公報WO 97/07668およびWO 97/07669は、卵母細胞であり得る受容細胞に、体細胞の核を移す方法を記載している。WO 97/07668およびWO 97/07669の両方が、胚芽形成およびその後の移植が良好に行われるために、ドナー細胞核が静止状態になくなくてはならないことを教示している。さらなる培養または宿主母体への移植の前に、核移植により生成されたどの胚が多機能細胞を含むか認識し得ることが有利である。

#### 【0008】

本発明は、幹細胞、および幹細胞を得るための改良された方法を提供することを目的とする。本発明は、トランスジェニックヒトES細胞を含むヒトES細胞を得るための改良された方法を提供することも目的とする。本発明は、さらに、体細胞核を全能状態に再プログラムし得る因子についてのアッセイ、およびES細胞を含む胚または胚構造の認識のためのアッセイを提供することを目的とする。

#### 【0009】

(発明の開示)

本発明は、体細胞から除核卵母細胞への核の移植と、所望の幹細胞に特徴的な遺伝子を発現する卵母細胞の娘細胞の認識との組み合わせを提供する。本発明の好ましい態様において、胚幹細胞に特徴的な遺伝子を発現する細胞が認識される。

#### 【0010】

従って、本発明の第1の局面は、  
予定の種の幹細胞を得るための方法であって、

(a) 所望の幹細胞および(b) 所望の幹細胞以外の細胞において特異的に発現されるマーカーをコードする遺伝子を含む、予定の種の体細胞を得ること、  
除核卵母細胞を得ること、

体細胞の核を、除核卵母細胞中に移してトランスジェニック卵母細胞を形成すること、

トランスジェニック卵母細胞を生体外で培養して、トランスジェニック卵母細胞から誘導された細胞の培地を生成すること、および

マーカーを発現する培地の細胞を認識すること、ならびに任意に、それらを選択的にプログラムすることを含んでなる方法を提供する。

#### 【0011】

良好に成熟期を迎え生体を形成する胚および胚構造の認識を容易にすることが、本発明の特別の利点である。生存能力がある胚の割合が1%以下の少量である従来法の高い失敗率のために、今まで、この技術は信頼性が非常に低かった。本発明の方法は、さらに、トランスジェニック卵母細胞を培養して胚または胚構造を形成すること、および、胚または胚構造の細胞がマーカー遺伝子を発現するかどうか決めることを含む。多機能細胞は、肺構造の内部細胞塊を形成することが知られており、この方法は、典型的に、トランスジェニック卵母細胞を培養して内部細胞塊および栄養外胚葉細胞を含む胚または胚構造を形成すること、および、内部細胞塊の細胞がマーカー遺伝子を発現するかどうか決めることを含む。

#### 【0012】

マーカー遺伝子を含む体細胞は、トランス遺伝子を体細胞に導入することにより、または、トランスジェニック動物からトランス遺伝子を含む体細胞を単離することにより得ることができる。すなわち、本発明は、トランスジェニック幹細胞の第1世代および子孫世代を含む。第1世代のトランスジェニック細胞の発生のためには、体細胞から出発して、トランス遺伝子を体細胞に導入してから、除核卵母細胞に核を移す次の工程を行うことが特に好ましい。体細胞は、任意の標準的生検処置により得ることができる。

#### 【0013】

本発明の技術の重要要素は、所望の幹細胞を容易に認識するためのマーカーの使用である。本発明の特定の態様において、多機能幹細胞である細胞は、緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する。UV光を用いて、視覚的に検査することにより、

生存能力の無いものが廃棄され得るように細胞または胚が分別される。

【0014】

本発明の1つの態様において、マーカーは選択性マーカーであり、選択性マーカーを発現しない細胞は培地において選択的に殺されまたは除去され得る。例えば、選択性マーカーは、ネオマイシン抵抗またはG418抵抗をコードする遺伝子のような、抗生物質抵抗性であり得る。

【0015】

多機能ES細胞の単離および増殖は、文化細胞の除去により容易になる。これは、ICMマーカー遺伝子であるoct4、または、fgf4のようなOct-4反応性遺伝子、またはSox2のようなOct-4共因子のための遺伝子、またはICMおよび原外胚葉細胞において選択的に発現される任意の他の遺伝子の調節配列の制御下に選択性マーカーを発現することにより好適に達成される。選択性マーカーは、相同組換えにより内因性遺伝子中に組み込む、またはトランス遺伝子構造体に挿入することができる。さらに、多機能細胞の拡張を容易にするために、条件不老化遺伝子を幹細胞特異性座に導入することができる。機能的再プログラムの主な指示手段および胚芽成長の予備条件は、大部分または全ての細胞中においてOct-4を発現する多機能ICM/原外胚葉の形成でなくてはならず、これは、哺乳動物胚における多機能細胞の成長にOct-4が必須であることが知られているのと同じである。そのような胚は、高速の移植後成長を提供し、ES細胞の供給源として用いることができる。

【0016】

別の手段はレポーター遺伝子になるマーカーであり、マーカーを発現する細胞を培地中において視覚的に認識することができる。1つの適当なレポーターは、前述のUV光におけるGFP、またはルシフェラーゼのような特定の光で蛍光を発する産物をコードするものである。もう1つのものは、Xgalで青色、またはフルオレセインジガラクトシダーゼ(FDG)で蛍光信号を発する緑/ガラクトシダーゼである。所望の細胞の認識に単純な技術で充分であるように光学顕微鏡において全て用い得ることが特に好都合である。菌株は、染色組織の固定-死滅を必要としない点で、好ましくは生存能力のある菌株である。

## 【0017】

本発明の特定の態様の方法の使用において、専ら胚幹細胞において活性であるプロモーターを含み、GFPまたは幹細胞特異的遺伝子産物に融合しているGFPの発現を導くトランス遺伝子が、複数のヒト体細胞に導入される。次に、体細胞核が、各々、除核ブタ卵母細胞に移される。次に、卵母細胞が培養されて胚構造が形成され、これらは、UVが照射され、顕微鏡で観察される。ICM中において蛍光を示す僅かのものを容易に認識し単離することができる。その次に、単離された胚構造をさらに生体外で培養または移植することができる。マーカーの使用は、このように、以前は、実際に生存可能な胚でないことを示す、移植不可能性、成熟期まで進めないこと、またはその後の形態学変化に基づいて認識しなくてはならなかった生存可能でない胚の廃棄を容易にする。

## 【0018】

さらなる別法は、不朽化遺伝子をコードするトランス遺伝子である。これは、その方法により得られる胚幹細胞の長期培養の維持に役立つ。

## 【0019】

本発明のさらなる特別の態様の方法の使用において、専ら胚幹細胞において活性なプロモーターを含み、ネオマイシンへの抵抗の発現を導くトランス遺伝子が、複数のヒト体細胞に導入される。次に、体細胞は、各々、除核ウシ卵母細胞に移される。次に、卵母細胞が培養されて胚構造が形成され、そこから、多機能幹細胞であるらしい細胞が単離される。これらの細胞は、G418の存在下に培養され、未分化ES細胞であるもののみが生き残ることができる。

## 【0020】

本発明の特定の態様の方法の使用において、専らニューロン幹細胞において活性であるプロモーターを含み、選択性マーカーの発現を導くトランス遺伝子が、複数のヒト体細胞に導入される。次に、体細胞核が、各々、除核受容細胞に移される。次に、受容体が培養され、これらは選択に付される。生存する僅かのものを容易に認識し単離することができる。その次に、単離されたニューロン幹細胞をさらに生体外で培養することができる。マーカーの使用は、このように、非ニューロン幹細胞の廃棄を容易にする。ニューロン幹細胞を得るための前記態様に

おけるように、ES細胞以外の標的幹細胞を得ることが目的である本発明の態様においては、受容体は卵母細胞であるか、好ましくは、異なる個体の標的幹細胞である。すなわち、移植体細胞核の受容体として除核ニューロン幹細胞が用いられる。すなわち、ニューロン幹細胞を得るために、まず、複数の体細胞が遺伝的に操作されて、ニューロン上皮前駆細胞において均一に発現される遺伝子である *sox1*、*sox2* または *sox3* の調節要素の制御下において *βgeo* のような選択／レポーター遺伝子が導入される。例えば、選択／レポーター遺伝子である *βgeo* が、相同組換えにより *sox2* 遺伝子に組み込まれ、これは、ニューロン板およびニューロン管における前駆体細胞において均一に発現される。この構造体を含むトランス遺伝子が、体細胞に導入され、核移植の後に G418 を適用することにより、生存能力のある *βgeo* 陽性細胞が効果的に単離される。これらの細胞は、ニューロン上皮前駆細胞のマーカーを発現する。これらは増殖されることができ、種々のニューロンマーカーを発現するニューロン様細胞のネットワークに効果的に分化する。すなわち、哺乳動物ニューロン分化の遺伝的および分子的解離のための生体外系が本発明により提供され、正常な純粋集団または遺伝的に修飾されたニューロン前駆体の生成のための経路、および移植を含む機能的研究のためのニューロンも提供される。CD34、CD44 および SCL 遺伝子が、造血始原細胞を得るのに適しており、Nkx2.5 または GATA-4 遺伝子が心臓始原細胞を得るのに適している。筋始原細胞の発生には、MyoD または myf-5 が適している。

#### 【0021】

本発明の方法が、さらに、体細胞中に、いずれも所望の幹細胞中で発現される選択性マーカーおよびレポーターマーカーを導入することを含むことが、さらなる選択肢である。これは、生存可能な胚の視覚的認識および単離を可能にし、次に、それを培養し、その後のES細胞の単離のために選択に付することができる。得られる培地は、トランス遺伝子および受容体である細胞質体ミトコンドリアの存在を除いて、最初のドナー体細胞と遺伝的に同じである幹細胞を含む。トランス遺伝子に隣接する切除部位の使用は、部位特異的組換えによるように、トランス遺伝子の除去を可能にするのに適している。

## 【0022】

本発明の技術は、全ての哺乳動物細胞型に適用され、受容体卵母細胞の利用性が低い（または無い）種の胚幹細胞を得るものである。体細胞はヒト細胞であることが好ましく、驚くべきことに、本発明は、非ヒト卵母細胞からヒト胚幹細胞を作るものであり、以下の実施例では、容易に入手されることからブタまたはウシ卵母細胞を用いている。

## 【0023】

一旦胚幹細胞が単離されると、それらは、選択された系列の始原細胞の誘導のための供給源として用いることができる。1998年4月14日に出願された継続中のGB特許出願9807935、3に記載され特許請求されているように、所望の始原細胞中においてのみ実質的に発現されるさらなるトランス遺伝子を用いて、ニューロン、造血始原細胞、心臓および他の始原細胞が得られ、選択された分化非幹細胞系の細胞も同様に得ることができる。

## 【0024】

本発明の第2の局面は、幹細胞を得るための方法であって、

（a）所望の幹細胞および（b）所望の幹細胞以外の細胞において特異的に発現されるトランス遺伝子を含む体細胞を個体から得ること、

体細胞の核を、除核卵母細胞中に移すこと、

卵母細胞を培養して胚または胚構造を形成すること、および

得られる胚または胚構造中の細胞がトランス遺伝子を発現しているかどうか決めること

ことを含んでなる方法を提供する。

## 【0025】

この方法は、好ましくは、トランス遺伝子が、（a）内部細胞塊の細胞および（b）内部細胞塊の細胞以外の細胞において特異的に発現され、方法は、卵母細胞を培養して胚または胚構造を形成すること、および、内部細胞塊の細胞がトランス遺伝子を発現するかどうか決めることを含んでなる、哺乳動物胚幹細胞を得るためのものである。トランス遺伝子が、内部細胞塊の細胞中のみにおいて実質的に発現されることが特に好ましい。胚盤胞が生体内、例えば、結さつされた輸

卵管において成長することが選択肢である。

【0026】

トランス遺伝子は選択性マーカーをコードすることができ、そこで選択性マーカーを発現しない細胞は培地中において選択的に殺すまたは除去することができる；または、トランス遺伝子は、特定波長の光を照射したときに蛍光発生するレポーターマーカーをコードすることができ、そこで、レポーターマーカーを発現する細胞は、光の存在下におけるその蛍光により認識され得る。本発明の第1の局面の他の好ましい選択的特徴が、本発明の第2の局面およびさらなる局面に同等に適用される。

【0027】

本発明の第3の局面は、体細胞の核に対する、因子の効果についてのアッセイであって、

(a) 所望の幹細胞および(b) 所望の幹細胞以外の細胞において特異的に発現されるマーカーを含む核を除核細胞に導入すること、

因子をその細胞中に導入すること、

その細胞を生体外培地中に維持すること、および

その細胞またはその娘細胞のいずれかがマーカーを発現しているかどうか決めることを含んでなり、マーカーの発現は、その体細胞核が再プログラムされて所望の幹細胞の核になっていることを示すものである方法を提供する。

【0028】

「再プログラムされた」および修飾された用語により、成長可能性が制限されている細胞からの核が、より大きな成長可能性を得ること、例えば、分化体細胞からの単一機能核が、それにより、幹細胞の多機能核に導かれ得る、または、体細胞からの多機能核が、それにより、多機能幹細胞核に導かれ得ることが意味される。好ましくは、除核卵母細胞中に移植されたときに正常胚の成長を容易にすることができる、次に、移植して成熟期を迎えて生体動物を形成することができる、または、次に、胚幹細胞および、続いて、望まれる場合は分解された細胞を誘導するために用いることができるように、体細胞核を再プログラムすることができる。



**【0029】**

このアッセイの利点は、核の再プログラムを誘発する因子のスクリーニングを補助することである。そのように認識される因子は、次に、技術の信頼性および効果をさらに向上させるための作用因として用いることができる。このアッセイは、除核卵母細胞を用いて好適に行われる。このアッセイは、卵母細胞以外の除核細胞を用いても好適に行われ、これは、卵母細胞が用いられる場合のように、既に同時に存在する核再プログラム因子から干渉を受けること無く因子の効果がアッセイされるという利点を有する。線維芽細胞は、好適な細胞型である。

**【0030】**

核を再プログラムして多機能核にする因子を認識するために、アッセイにおいて用いられるマーカーは、(a) 多機能幹細胞および (b) 多機能幹細胞以外の細胞において特異的に発現される。

**【0031】**

このアッセイは、卵母細胞の細胞質から抽出されたmRNAから得られたcDNAライブラリーの発現により得られる因子のライブラリーのような、因子のライブラリーのアッセイに適している。

**【0032】**

前記手順に別法として、体細胞の核を再プログラムするのは、核を移動させることなく行われ、それにも拘わらず因子の認識を提供するアッセイのための選択肢である。

**【0033】**

具体的に、このアッセイは、

(a) 所望の幹細胞および (b) 所望の幹細胞以外の細胞において特異的に発現されるマーカーを含む細胞の培地を維持すること、

その細胞中に、アッセイすべき因子を導入すること、および

その細胞またはその娘細胞のいずれかがマーカーを発現しているかどうか決めることを含み、マーカーの発現は、その体細胞核が再プログラムされて所望の幹細胞の核になっていることを示す。

**【0034】**

本発明のこの態様は、例えば線維芽細胞中のOCT4を活性化する因子を認識するための卵母細胞ライブラリーのアッセイのために、都合良く用いることができる。

#### 【0035】

成熟期を迎える可能性がある胚、および多機能細胞を含む胚構造についてのアッセイも望ましい。すなわち、本発明の第4の局面は、胚または胚構造が胚幹細胞を含むかどうか決めるアッセイであって、

(a) 胚幹細胞および(b) 胚幹細胞以外の細胞において特異的に発現されるマーカーを含む体細胞の核を除核卵母細胞に導入すること、

そこから胚または胚構造を得ること、および

胚または胚構造の細胞がマーカーを発現するかどうか決めることを含んでなるアッセイを提供する。

#### 【0036】

本発明の1つの態様において、このアッセイは、体細胞中に、原外胚葉細胞中においてのみ実質的に活性化されるプロモーターの制御下にマーカーをコードする配列を含むトランス遺伝子を導入することを含む。1つの具体例は、oct4プロモーター、またはoct4遺伝子が発現する細胞中において活性化されるプロモーターである。

#### 【0037】

トランス遺伝子の導入後、安定に形質移入される幾つかの体細胞があるが、多くはそうではない。本発明の好ましい態様において、トランス遺伝子は、実質的に全ての細胞中において活性化されるプロモーターの制御下に第2のマーカーをコードする配列も含む、またはその配列が共形質移入され、そのアッセイは、体細胞が第2のマーカーを発現するかどうか決めることによりトランス遺伝子が核中に安定に組み込まれているかどうか決めることを含む。 $\beta$ -アクチンが一例である。このようにして、第1のマーカーを発現するものを決める前に、および任意に、核移植の工程前に、安定な形質移入体を認識することができる。好ましくは、第2のマーカーは、安定形質転換体の選択を可能にする選択性マーカーである。第2のマーカーは、切除部位に隣接して、さらなる操作の前の除去を可能に

することができる。

【0038】

本発明の第5～第12の態様において、本発明による核転移により得られる細胞、すなわち；

ヒト卵母細胞から誘導されるヒト胚幹細胞；

非ヒト卵母細胞から誘導されるヒト胚幹細胞；

非ヒト哺乳動物卵母細胞から誘導されるヒト胚幹細胞；

ブタまたはウシ卵母細胞から誘導されるヒト胚幹細胞；

ヒト卵母細胞から誘導されるヒト胚幹細胞；

非ヒト卵母細胞から誘導されるヒト胚幹細胞；

非ヒト哺乳動物卵母細胞から誘導されるヒト胚幹細胞；および

ブタまたはウシ卵母細胞から誘導されるヒト胚幹細胞；

が提供される

本発明は、さらに、第1のヒトに移植するためのものであって、第1のヒトと免疫学的に適合性がある、異なるヒトの卵母細胞から誘導された幹細胞；および、第1の種と同じ種または第1の種以外の種の卵母細胞から誘導されると共に、胚幹細胞中のみで実質的に発現される選択性マーカーをコードするトランス遺伝子を含んでなる、第1の哺乳動物種の胚幹細胞；および、未分化状態を認識するトランス遺伝子を発現する多機能細胞であって、トランス遺伝子の存在以外は生体動物と遺伝的に同じである多機能細胞を提供する。

【0039】

本発明は、さらに、第1のヒト個体に移植するためのヒト幹細胞またはヒト体細胞の誘導の適しているヒト胚幹細胞を得る方法であって、第1の個体のものとは異なる卵母細胞中に、第1の個体の体細胞からの核を導入することを含んでなる方法を提供する。ヒト胚幹細胞は、好ましくは、ヒト胚幹細胞中のみで実質的に発現される選択性マーカーをコードするトランス遺伝子を含む。

【0040】

本発明は、さらに、体細胞核を多機能核に再プログラムする方法であって、本発明の第3のアッセイを行うことにより核の再プログラムを誘発する因子を

認識すること、

体細胞核を得ること、

除核細胞を得ること、

体細胞核を除核細胞中に移して組換え細胞を形成すること、および

その組換え細胞中に因子を導入すること

を含んでなる方法を提供する。

#### 【0041】

本発明は、さらに、体細胞核を多機能核に再プログラムする方法であって、

本発明の第3の局面のアッセイを行うことにより核の再プログラムを誘発する因子を認識すること、

体細胞核を得、因子を導入すること、

除核細胞を得ること、

体細胞の核を除核細胞中に移して組換え細胞を形成すること、および

その組換え細胞を生体外で培養すること

を含んでなる方法を提供する。

#### 【0042】

これらの前記2つの方法において、体細胞に、(a) 所望の全能細胞および(b) 所望の全能細胞以外の細胞において特異的に発現されるマーカーをコードする遺伝子を導入し；胚の細胞がマーカーを発現しているかどうか決めることが任意に成される。再プロ面無因子がアッセイにより認識されても、これらの任意の工程を用いることは、再プログラムされた核の単離を容易にし、次に、その核を、要すれば増殖され、除核卵母細胞に導入することができる。

#### 【0043】

本発明の典型的方法の使用において、多機能細胞特異的選択性マーカーおよび／またはレポーターおよび／または不朽化遺伝子が体細胞培地、例えば、胚芽または生体線維芽細胞の培地に導入され、前記マーカーを有している細胞からの核が、除核卵母細胞または他の適当な細胞質体中に移される。次に、幹細胞特異的マーカーの発現の視覚化または選択により、良好な再プログラムが検出または選択される。多機能幹細胞培地が、マーカー遺伝子発現の選択および／または不朽

化遺伝子の影響下に単離され増殖される。

#### 【0044】

以下の実施例に記載する本発明の特別の態様において、選択性マーカー／レポーターが、必須の多機能細胞特異的転写因子Oct-4 (Mountfordら著、1994年) をコードする遺伝子の調節要素の制御下に導入される。もう1つの態様において、選択性マーカーが、fgf4遺伝子のようなOct-4反応性配列またはSox2のようなOct-4の幹細胞制限共因子、あるいは別のICM／原外胚葉特異的遺伝子の調節制御下に置かれる。選択性マーカーは、好ましくは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼまたはGFPのようなレポーター遺伝子機能と、薬剤抵抗機能との両方をコードする。この二重機能は、lacZ／neo融合 $\beta$ geoのような融合遺伝子として、または、内部リボソーム登録部位(IRES)を組み込むジストロン性構造体、例えばgfpiRESpacとして達成される。別の態様において、トランス遺伝子構造体は、多機能幹細胞のその後の成長を容易にするために、不朽化遺伝子を組み込むことができる。これは、選択性マーカー／レポーターの代わりにまたはそれに加えて含んでよい。1つのそのような不朽化遺伝子は、SV40ラージT蛋白をコードするものである。不朽化遺伝子は、例えば、温度またはホルモン制御変数を用いることによりおよび／または部位特異的組換えもしくはエンドヌクレアーゼ分解のための標的配列の組み込みにより条件的になる。レポーター、選択性マーカーおよび不朽化遺伝子の組み合わせを、遺伝子融合および／またはIRES要素を用いて単一構造体中に導入する、または別々にトランスジェニック構造体を導入することができる。

#### 【0045】

POU転写因子Oct-4は、ICMおよび原外胚葉中および生殖細胞中における全ての多機能細胞中において発現される。Oct-4は、成熟栄養外胚葉および全ての他の分化細胞型に存在しない。本発明は、ICMの多機能的同一性の達成においてOct-4が必要であることを発見した。oct-4遺伝子が不活性化されている胚盤胞段階の胚において、内部細胞は、ICM特性を発現することができず、栄養外胚葉系列に分かれる。Oct-4機能は、ES細胞の多機能性の維持にも連続的に必要とされる。完成したES細胞培地中におけるoct-

4 遺伝子の不活性化により、自己再生および末端分化ができなくなる。Oct-4 は、複数標的遺伝子の発現を制御する。線維芽細胞成長因子-4 (FGF-4) のための遺伝子のような、Oct-4 により積極的に制御される遺伝子は、ICM および原外胚葉において発現の類似制限パターンを示す。Oct-4 は、HMG-ボックス転写因子 Sox2 および、その発現が初期胚において同様に制限され得る E1A 様活性のような共因子と共同して作用する。

#### 【0046】

選択性マーカーは、好ましくは、oct-4 遺伝子中への相同組み込み、またはトランス遺伝子構造体のランダム組み込みにより、Oct-4 制御配列の転写制御下に置かれる。その例において、選択性マーカーは、oct-4 遺伝子の 3' UTR に組み込まれ、oct-4 停止コドンに対して直ぐ 3' 末端側に挿入される EMCV IRES が前に置かれる。また、選択性マーカーは、ATG 開始コドンに直に組み込まれる、または Oct-4 コード化配列のフレーム内に、あるいは、Oct-4 コード化配列の任意のフレーム内に配され、その場合、oct-4 読み枠中の転写停止コドンおよび IRES 要素が前に置かれるべきである。任意に、トランス遺伝子は、その後の欠失を可能にするための Cre または Flp のような部位特異的リコンビナーゼのための認識配列に隣接させる、または、lscel のような希制限部位エンドヌクレアーゼのための部位を含むことができる。培地中の体細胞中への導入のために、トランス遺伝子構造体は、通常、安定形質移入対の単離を可能にするために独立した選択性マーカーを含む構造体を含む、またはその構造体が共形質移入される。この選択性マーカーは、oct-4 遺伝子中に挿入されたものと異なるべきであり、標的体細胞中において活性なプロモータ、例えば、 $\beta$ -アクチンのような遍在的に発現される遺伝子のプロモーターの転写制御下になくてはならない。独立した選択性マーカーは、その後の切除を可能にするための部位特異性リコンビナーゼのための認識配列に隣接させることができる。これらの部位は、その後の切除を避けるために、幹細胞特異的マーカートランス遺伝子に隣接する部位とは異なるリコンビナーゼについてのものでなくてはならない。

#### 【0047】

トランス遺伝子構造体は、多核注入により導入して、体細胞を単離し得るトランスジェニック動物を発生させることができる、または、生体内で体細胞に直接導入する、もしくは、培地中で、ミクロ注入に、ウイルス形質導入、リポフェクション、電気穿孔、燐酸カルシウム共沈降または他の方法により導入される。トランス遺伝子の完全性、および合法または非合法組換えにより組み込みは、ゲノムのDNA分析により決められる。適当な場合、適当な部位特異的リコンビナーゼの一時的導入を用いて、独立した選択性マーカーを欠失させる。

#### 【0048】

トランス遺伝子を有している細胞の核が、確立された手順（Campbellら著、1996年；Wilmutら著、1997年）を用いて、または、融合ではないミクロ注入の使用のような改良技術により、除核卵母細胞または他の適当な細胞質体中に移される。受容体卵母細胞は、ドナー細胞と同じ種または異なる種であってよい。すなわち、ウシまたは他の動物の卵母細胞を、ヒト体細胞核の再プログラムのために用いることができる。核転写に続いて、活性化された再構築卵母細胞を、感作雌の生殖管に移して生体内で成長させることができ、続いて、胚盤胞段階において回収および試験される。核転移胚の生体内成長は、同じまたは異なる種の動物において、好ましい異所性部位、例えば、生殖管中または皮下に配する、または被包により達成することもできる。また、胚盤胞段階において生体外でそのまま培養することにより胚を成長させることができる。レポーターの発現は、固定検体の組織化学的または免疫組織化学的分析により決めることができるが、より一般的には、GFPについては直接、または $\beta$ -ガラクトシダーゼについては蛍光基質を用いて、生体蛍光染色の視覚化により生体胚において試験される。

#### 【0049】

ICM／原外胚葉における特異的かつ均一な染色を示す胚が、胚または生きている子孫を生成するために受容体に移すために選択される。幹細胞系の誘導のために、胚を、培地に直接、外植することができる。また、幹細胞区画を、まず、移植し短期間の後移植成長を行うことにより、および／または、奇形腫成長について同系または免疫無防備宿主の腎臓嚢胞または睪丸のような異所性部位に、分

割段階の胚、胚盤胞または卵筒を移植することにより、生体内で拡張することができる（Solterら著、1970年）。胚および受容体は、奇形腫形成について同じ種である必要はない。ヒト奇形腫の誘導は、例えば、ヌードまたはSCIDマウスにおいて達成することができる。胚材料または奇形腫から開始した培地を、連続的に成長するES細胞が達成されるまで、選択薬剤の存在下に維持する。多機能EG細胞培地（Matsuiら著、1992年）は、子宮の移動および移植に続いて、原始生殖細胞から開始することもできる。また、培養は、非幹細胞の除去のために、選択剤の存在下に行われる。

#### 【0050】

図面により示される本発明の特定の態様の説明を以下に記する。

#### 【0051】

図1は、本発明によるOct4- $\beta$ geoへ発現構造体を示す。

図2は、卵筒段階胚、6.5dpc（上側パネル）および戻し交配からの胚盤胞（下側パネル）を示し、ICMにおける $\beta$ -ガラクトシダーゼ、およびトランスジェニック胚の原外胚葉の発現を示している。

#### 【0052】

図3は、トランスジェニック胚の培養された原外胚葉を示し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現が培地中に維持されていることを示している。

#### 【0053】

図4は、（A）桑実期および（B）胚盤胞段階のOct4-bgeoトランスジェニックマウス胚における $\beta$ -ガラクトシダーゼ染色を示す。

#### 【0054】

図5は、非トランスジェニック受容体細胞質体へのOct4-bgeo体細胞核に移動の後の、核転移マウス胚における $\beta$ -ガラクトシダーゼ染色を示す。

#### 【0055】

（実施例）

##### 実施例1

Oct-4座に及ぶマウスゲノムクローンを、菌株129ゲノムライブラリーから単離し、制限分析によりマッピングした。遠位および近位5'エンハンサー



要素、全構造遺伝子、翻訳停止コドンの位置に挿入されている I R E S  $\beta$  g e o カセット、3' 非翻訳配列、および数 k b の 3' 配列を含む、トランス遺伝子構造体を調製した (図 1)。

#### 【0056】

このトランス遺伝子を有しているトランスジェニックラットを、予備核注入により発生させた。これらのラットにおいて、トランス遺伝子の発現は、O c t - 4 の発現を中実に繰り返した。すなわち、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が、胚盤胞の内部細胞塊および初期移植後胚の原外胚葉中に存在していたが、胚外系列および分化胚生殖細胞層には存在しなかった (図 2)。 $\beta$ -ガラクトシダーゼの原腸形成後発現を、生殖細胞に限定した。また、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性、すなわち、選択性マーカーの特異的発現も、培地において維持した (図 3)。

#### 【0057】

トランス遺伝子が、多機能細胞特異的発現を支配するように適当な調節配列を含むことを確認し、培養された体細胞中への形質移入のために修飾した。これらの細胞において O c t 4 は発現されないので、これは、独立して発現された選択マーカーの導入を必要とした。マウス p g k - 1 プロモターの転写制御下におけるハイグロマイシン抵抗性-チミジンキナーゼ融合遺伝子 (h p h / t k) を、非翻訳領域の下流のトランス遺伝子の 3 鑄 [部に導入した。p g k - h p h / t k カセットに、l o x P 部位が隣接し、全トランス遺伝子フラグメントに f r t 部位が隣接していた。

#### 【0058】

線状化した構造体を、電気穿孔により一次マウス胚線維芽細胞中に導入し、ハイグロマイシンの存在下にクローン単離物を選択した。クローンを、200  $\mu$  g / m l の G 4 1 8 の存在下に少量を塗布することにより O c t - 4 トランス遺伝子の異所性活性についてアッセイした。G 4 1 8 の成長に失敗したもののみを、さらに研究した。サザン分析により決められる単一のコピーが形成された 3 つのクローン (I、II および III) を、C r e リコンビナーゼで一時的に形質移入し、ガンシクロビル (g a n c y c l o v i r) の存在下を選択した。ガンシクロビル抵抗性クローンを、P C R によりスクリーニングして、p k g - h p h

／t kカセットのC r e 媒介切除を確認した。このカセットの気質は、O c t - 4トランス遺伝子の活性の干渉の可能性を除去する。

#### 【0059】

O c t - 4  $\beta$  g e oトランス遺伝子のみを有する得られたクローンを、マウス、ヒツジおよびウシ除核卵母細胞への核転移に用いた。卵母細胞を、血清剥奪により休止させ、核転移を、C a m p b e l l ら（1996年）に記載のように行った。一部の場合において、数回の核転移を行った。核転移後に、活性化卵母細胞を、胚培地において培養し、分割、桑実形成、および胚盤胞成長についてモニターした。胚を固定し、X g a l を用いて $\beta$ -ガラクトシダーゼのために染色した。クローンI I 誘導体の核転移後に染色が観察されなかったが、これは、おそらく許容できない一体化部位によるものである。これに対してクローンI およびI I I の誘導体は、卵母細胞起源に拘わらず、胚盤胞段階まで成長した胚の30～50%においてI C M特異的染色を示した。全てのI C M細胞において、これらの約半分がモザイク状染色を示し、半分が均一な染色を示した。すなわち、形態学的に成長した胚盤胞の約25%しか、O c t - 4トランス遺伝子の正常発現を示さない。

#### 【0060】

次に、マウス卵母細胞中への核転移後に発生したO c t 4 -  $\beta$  g e o発現および非発現胚の成長性能を比較した。 $\beta$ -ガラクトシダーゼのための生体蛍光基質（M o l e c u l a r P r o b e s 製）を用いて、生きている胚においてトランス遺伝子の発現を視覚化した。胚盤胞を、非染色、モザイク状I C M染色または均一I C M染色として分類し、それに従って3つの群に分割した。各群を、別々の擬妊娠マウス受容体の子宮に入れた。マウスを、移植および成長の分析のために、5日後に殺した。最初の2つの群は、50%未満の移植を示した。どちらの場合にも、多数の吸収部位および以上胚が見つかった。クラスI の胚の転移後に、形態学的に正常な胚の成長は観察されず、クラスI I 胚により僅かに10中1の割合の移植が発生した。これに対して、クラスI I I 胚は、50%を超える移植を示し、胚の大部分は正常であった。次に、分析を繰返し、妊娠を最後まで進行させた。クラスI I I の胚のみから、生きて生まれた子孫が得られた。

## 【0061】

幹細胞系を単離するために、核転移胚を生体内で、胚盤胞晩期または移植初期段階まで成長させた。外胚葉を微小切除（B r o c kおよびG a r d n e r、1997年）し、G 4 1 8の存在下にE S細胞培地の培養物中に置いた。数日後、外胚葉を分離し置き換えた。未分化幹細胞の拡張している集団を発生させた。幹細胞系を、胚盤胞においてI C Mを免疫手術的に単離し、続いて、G 4 1 8を加えたE S細胞培地中において原始内胚葉および培養物を微小手術的に除去することにより、生体外で成長させた胚からも誘導した。

## 【0062】

再プログラムについてトランス遺伝子がコンピテントである線維芽細胞クローンIおよびI I Iを、再プログラムを媒介する因子についてのアッセイにも用いた。メッセンジャーRNAを卵母細胞から調製し、スクロースグラジエント上で分画し、線維芽細胞核に直接、微小注入した。次に、G 4 1 8選択を適用して、再プログラム活性を含むRNAプールを認識した。c DNA発現ライブラリーを陽性プールから調製し、線維芽細胞中に形質移入して、再プログラム因子をコードしている配列の単離を可能にした。

## 【0063】

## 実施例2

O c t - 4座に及ぶマウスゲノムクローンを、菌株129ゲノムライブラリーから単離し、制限分析によりマッピングした。遠位および近位5' エンハンサー要素、全構造遺伝子、翻訳停止コドンの位置に挿入されているI R E S  $\beta$  g e oカセット、3' 非翻訳配列、および数k bの3' 配列を含む、トランス遺伝子構造体を調製した（図1）。

## 【0064】

このトランス遺伝子を有しているトランスジェニックマウスを、予備核注入により発生させた。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を、固定された胚および組織のX g a l染色によりモニターし、桑実および胚盤胞段階予備移植マウス胚において明らかであった（図4）。期待されたように、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は、堆積細胞および胎児線維芽細胞核ドナーを含む体細胞において検出されなかった。

## 【0065】

核転移のためにトランスジェニックマウスの体細胞からの核を用いた。除核および非除核野生型卵母細胞を、受容体細胞質体として用いた。一部の場合において、数回の核転移を行った。核転移後に、活性化卵母細胞を、胚培地において培養し、分割、桑実形成、および胚盤胞成長についてモニターした。胚を固定し、X g a l を用いて  $\beta$ -ガラクトシダーゼのために染色した。成長の8細胞段階における核転移胚の約50%においてO c t 4発現に相当する染色が観察され(図5)、これは、核の再プログラムが良好であることを確認している。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示さなかった胚はO c t 4-b g e oトランスジェニック核を再プログラムすることができなかった、または、トランスジェニック核を機能的に組み込むことができず、従って、成長性能が低下したと記録した。

## 【0066】

$\beta$ -ガラクトシダーゼのための生体蛍光基質(M o l e c u l a r P r o b e s 製)を用いて核転移胚を染色して、生きている胚におけるトランス遺伝子の発現を視覚化することができる。非染色、モザイク状または均一染色として分類された胚を、核状態および、トランスジェニック発現プロフィールに基づく関連成長性能に従って分割した。

## 【0067】

引用文献リスト

## 【0068】

## 【表1】

Brook, F. A., and Gardner, R. L. (1997). The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *PNAS* 94, 5709-5712.

Campbell, K. H. S., McWhir, J., Ritchie, W. A., and Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380, 64-66.

Dominko T, Mitalipova M, Haley B, Beyhan Z, Memili E and First N, *Theriogenology*, Jan 1st 1998, Vol. 49, No. 1, page 385.

Evans, M. J., and Kaufman, M. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.

Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7634-7638.

Matsui, Y., Zsebo, K., and Hogan, B. L. M. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70, 841-847.

【0069】

【表2】

McWhir, J., Schnieke, A. E., Ansell, R., Wallace, H., Colman, A., Scott, A. R., and Kind, A. J. (1996). Selective ablation of differentiated cells permits isolation of embryonic stem cell lines from murine embryos with a non-permissive genetic background. *Nature Genetics* 14, 223-226.

Mountford, P., Zevnik, B., Duwel, A., Nichols, J., Li, M., Dani, C., Robertson, M., Chambers, I., and Smith, A. (1994). Dicistronic targeting constructs: reporters and modifiers of mammalian gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4303-4307.

Solter, D., Skreb, N., and Damjanov, I. (1970). Extrauterine growth of mouse egg cylinders results in malignant teratoma. *Nature* 227, 503-504.

Thomson et al, Proc. Natl. Acad. Sci., 1995 or 1996, Isolation of a Primate ES cell (details to be confirmed).

Thomson et al, Science 282, 1998, pp1145-1147, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.

Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., and Campbell, K. H. S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.

#### 【0070】

(産業上の利用分野)

このように、本発明は、核転移によりクローンされたトランスジェニック動物の生成の効率を増加させることができ、再プログラムを媒介または抑制する因子のためのアッセイを提供し、哺乳動物のためにES細胞を誘導する遺伝子的方法を提供し、任意の年齢のヒト個体から多機能幹細胞培地を達成する方法を提供する。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

図1は、本発明によるOct4-βgeoの発現構造体を示す図である。

**【図2】**

図2は、卵筒段階胚、6.5 d p c（上側パネル）および戻し交配からの胚盤胞（下側パネル）を示す図であり、ICMにおける $\beta$ -ガラクトシダーゼ、およびトランスジェニック胚の原外胚葉の発現を示している。

**【図3】**

図3は、トランスジェニック胚の培養された原外胚葉を示す図であり、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現が培地中に維持されていることを示している。

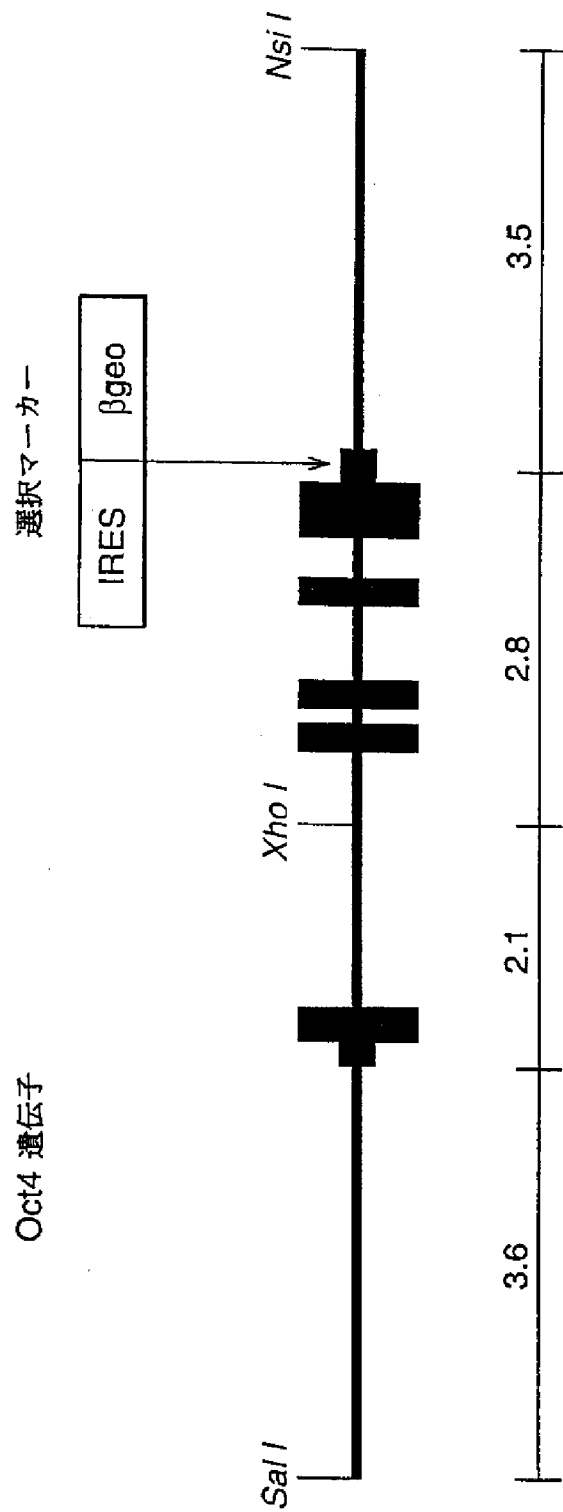
**【図4】**

図4は、（A）桑実期および（B）胚盤胞段階のOct4- $\beta$ geoトランスジェニックマウス胚における $\beta$ -ガラクトシダーゼ染色を示す図である。

**【図5】**

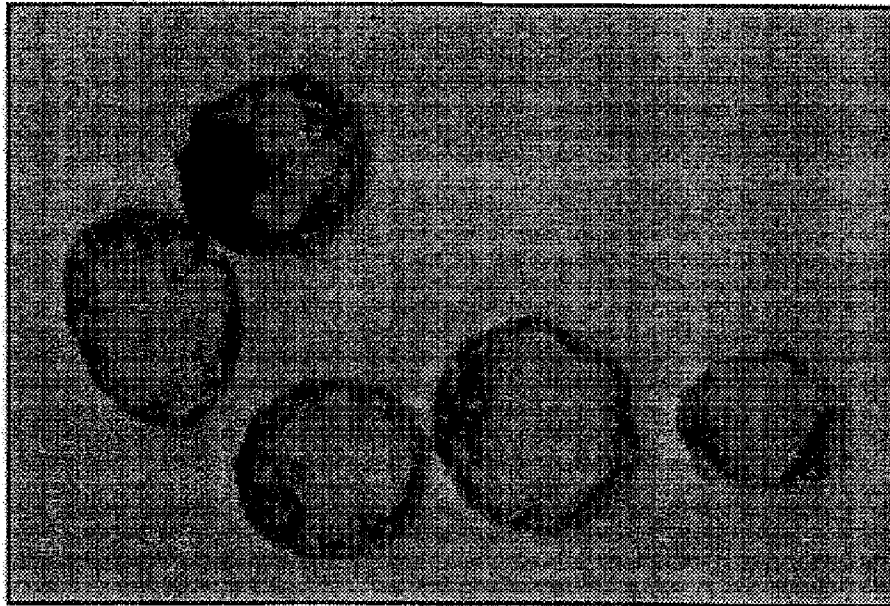
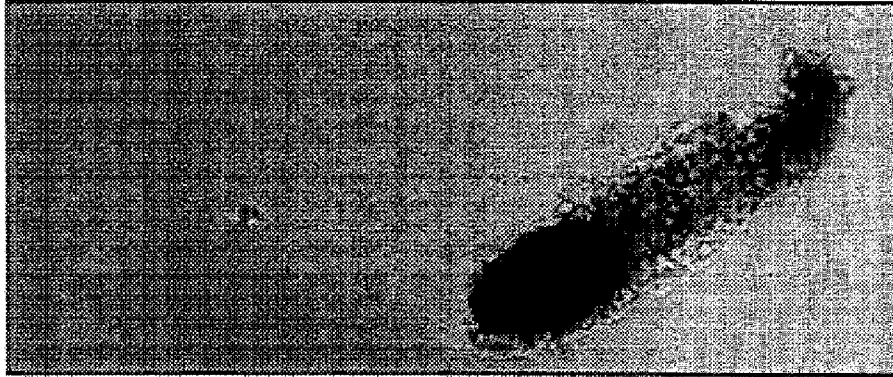
図5は、非トランスジェニック受容体細胞質体へのOct4-bgeo体細胞核に移動の後の、核転移マウス胚における $\beta$ -ガラクトシダーゼ染色を示す図である。

【図1】



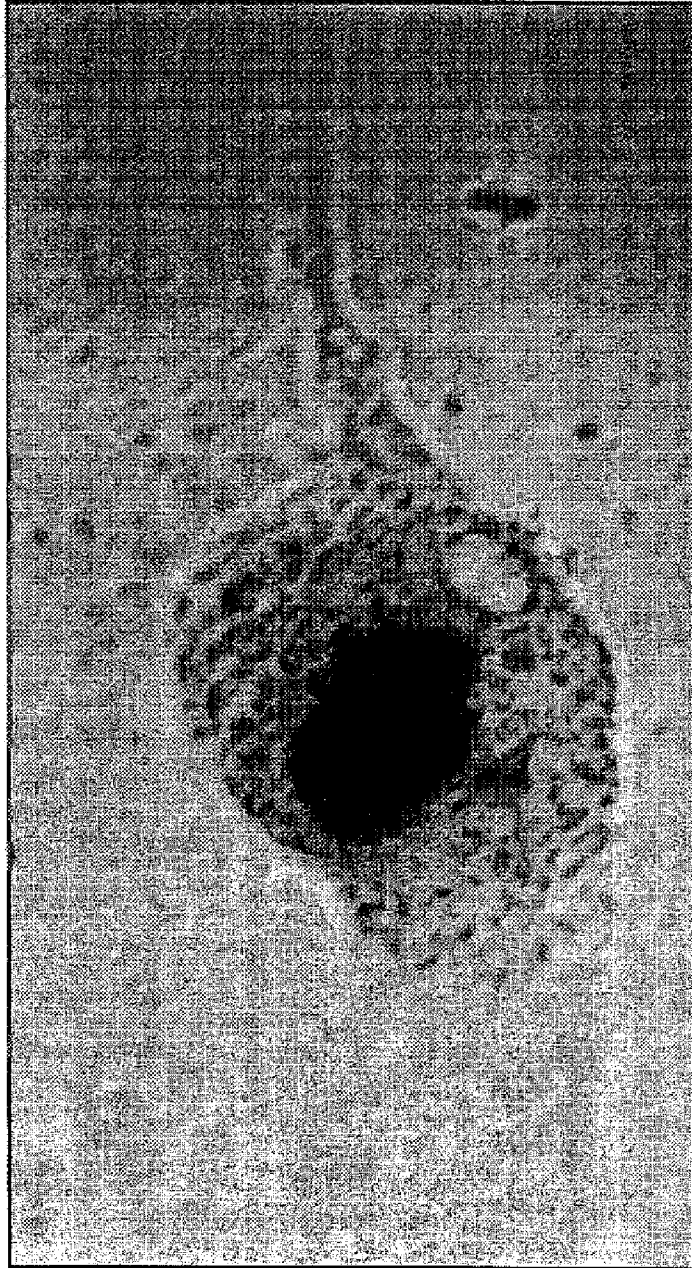


【図2】

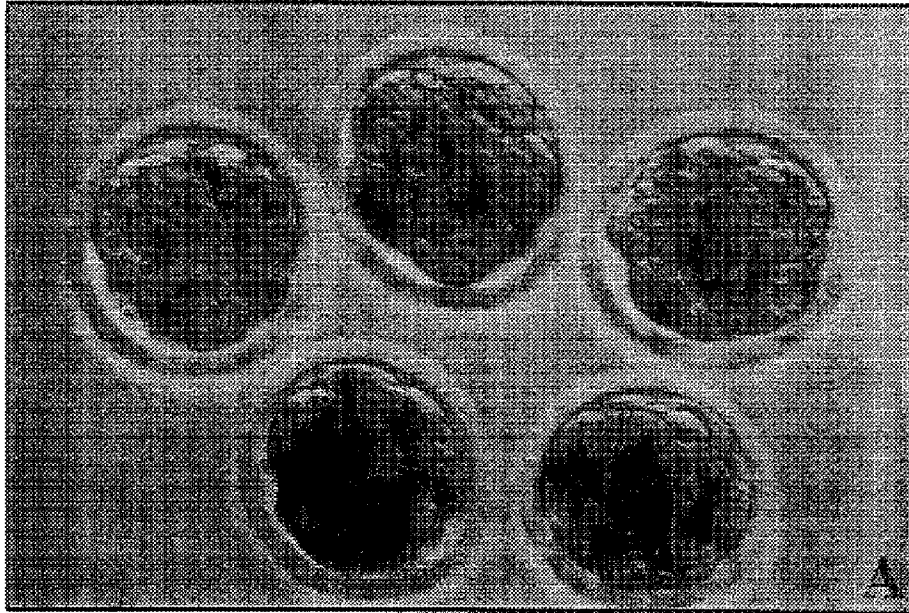
**FIG. 2**

【図3】

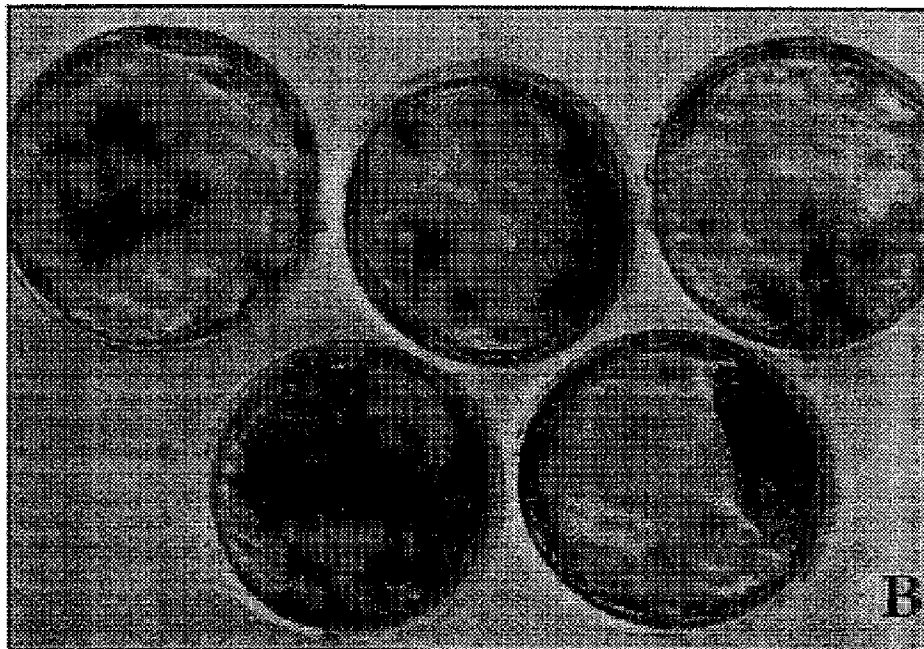
**FIG. 3**



【図4A】

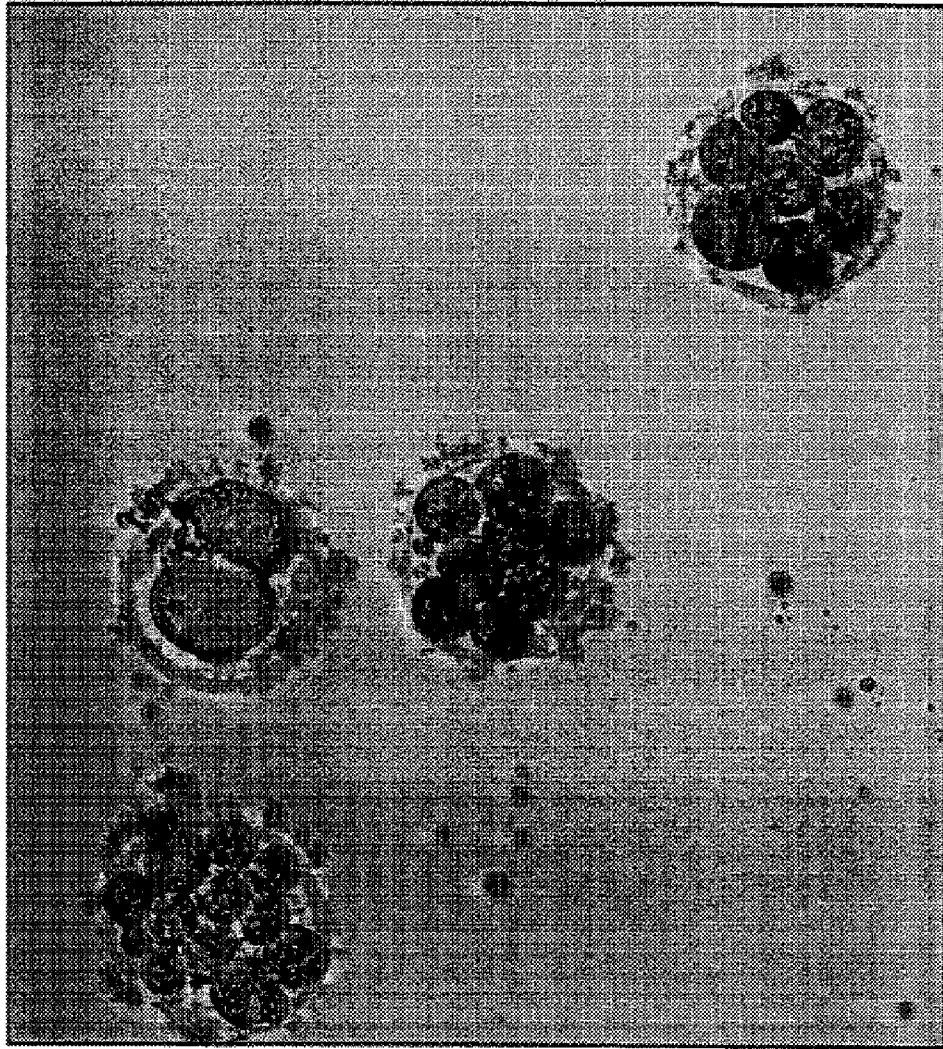
**FIG. 4**

【図4B】



【図5】

**FIG. 5**



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/GB 99/01333

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N5/06 C12N5/08 C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A01K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 94 24274 A (THE UNIVERSITY OF EDINBURGH) 27 October 1994 (1994-10-27) page 8, line 22 - page 9, line 5; claims 1-39	1-23, 30-36, 45
Y	WO 95 20042 A (PPL THERAPEUTICS (SCOTLAND) LTD.) 27 July 1995 (1995-07-27) page 5, line 15; claims 1-13, 22-27 page 12, line 10 - line 30	1-23, 30-36, 45
Y	WO 97 07669 A (ROSLIN INSTITUTE) 6 March 1997 (1997-03-06) cited in the application claims	1-23, 30-36, 45

-/-



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 November 1999

Date of mailing of the international search report

12/11/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 opo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3010

Authorized officer

Ryckebosch, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PL/GB 99/01333

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	J.A. THOMSON ET AL.: "EMBRYONIC STEM CELL LINES DERIVED FROM HUMAN BLASTOCYSTS." SCIENCE, vol. 282, 6 November 1998 (1998-11-06), pages 1145-1147, XP002121340 LANCASTER, PA, US cited in the application the whole document	37-40
P,Y	WO 99 19469 A (BIOTRANSPLANT, INC.) 22 April 1999 (1999-04-22) page 3, line 8 -page 4, line 11; claims 1-16,19-25 page 13, line 16 -page 14, line 4 -----	1-23, 30-36,45

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PL/GB 99/01333

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9424274 A	27-10-1994	AU 678233 B	22-05-1997
		AU 6542694 A	08-11-1994
		AU 678234 B	22-05-1997
		AU 6542794 A	08-11-1994
		CA 2161088 A	27-10-1994
		CA 2161089 A	27-10-1994
		EP 0695351 A	07-02-1996
		EP 0695361 A	07-02-1996
		WO 9424301 A	27-10-1994
		JP 9500004 T	07-01-1997
		JP 9500005 T	07-01-1997
		NZ 265090 A	24-03-1997
		NZ 265091 A	27-07-1997
		SG 41951 A	15-08-1997
		SG 48698 A	18-05-1998
		ZA 9402719 A	09-01-1995
		ZA 9402720 A	30-03-1995
WO 9520042 A	27-07-1995	AU 706243 B	10-06-1999
		AU 1461895 A	08-08-1995
		EP 0741781 A	13-11-1996
		JP 9508020 T	19-08-1997
WO 9707669 A	06-03-1997	AU 6831096 A	19-03-1997
		CA 2229568 A	06-03-1997
		CN 1202084 A	16-12-1998
		CZ 9800608 A	15-07-1998
		EP 0849990 A	01-07-1998
		EP 0930009 A	21-07-1999
		GB 2318578 A	29-04-1998
		GB 2331751 A	02-06-1999
		HU 9900234 A	28-05-1999
		NO 980845 A	29-04-1998
		NZ 316149 A	28-10-1999
		PL 325331 A	20-07-1998
WO 9919469 A	22-04-1999	AU 1073899 A	03-05-1999

## フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 マウントフォード、ピーター スコット  
 オーストラリア国 3168 ヴィクトリア州  
 クレイトン クレイトン ロード 246  
 モナシュ メディカル センター モナ  
 シュ ユニヴァーシティー インスティテ  
 ユート オブ リプロダクション アンド  
 デヴェロップメント

(72)発明者 マンシー、メガン  
 オーストラリア国 3168 ヴィクトリア州  
 クレイトン クレイトン ロード 246  
 モナシュ メディカル センター モナ  
 シュ ユニヴァーシティー インスティテ  
 ユート オブ リプロダクション アンド  
 デヴェロップメント

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA12 CA04 CA20  
 DAO2 GA14 HA12  
 4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QQ30  
 QQ57 QR02 QR10 QR59 QR77  
 QR80 QS05 QS24 QS28 QS38  
 QX02  
 4B065 AA90X AA91Y AA93Y AB01  
 AC10 AC14 BA03 BA25 CA24  
 CA44